益生菌大肠杆菌 Nissle 1917 抗逆性能、猪肠上皮细胞黏附率及抑菌效果研究

李金龙 邓 欢 刘金艳 毛俊霞 王 瑶 唐志如*

（西南大学动物科技学院，生物饲料与分子营养室验室，重庆 400715）

摘 要：本试验旨在研究益生菌大肠杆菌 Nissle 1917（EcN）抗逆性能、猪肠上皮细胞黏附率及抑菌效果。采用体外法对 EcN 进行生长曲线绘制和耐酸、耐胆盐、耐热性能的测定；以猪肠上皮细胞 IPEC-J2 细胞为体外细胞模型，考察了 EcN 对该细胞的黏附率以及对致病菌大肠杆菌 K88 的黏附抑制率；同时通过蛋白质印迹法检测了 EcN 对 IPEC-J2 细胞 β-防御素-2 和 Toll 样受体 4 的水平的影响。结果表明：1）EcN 对高酸、高胆盐和高温环境具有一定耐受能力。2）EcN 对 IPEC-J2 细胞的黏附作用以对数期最佳，黏附率达 33.96%，显著高于迟缓期、稳定期和衰亡期（*P*<0.05）。3）EcN 对致病菌大肠杆菌 K88 具有良好的抑制效果，黏附抑制率达 87.84%。4）EcN 还能上调 IPEC-J2 细胞 β-防御素-2 和 Toll 样受体 4 水平。结果提示，益生菌 EcN 具有较好的抗逆性能，能够良好地黏附猪肠上皮细胞，对致病菌大肠杆菌 K88 具有良好的抑制作用。

关键词：大肠杆菌 Nissle 1917；猪肠上皮细胞；IPEC-J2 细胞；黏附性能；抗逆性能；耐热性能；抑菌效果

中图分类号：S816.7

大肠杆菌 Nissle 1917（EcN）（血清型为 O6:K5:H1）是一株被德国医生 Alfred Nissle 在一战期间发现并分离得到的无致病性的革兰氏阴性益生菌[1]。EcN 的益生功能与其对肠道微生物的调控和肠道内细胞因子引起免疫反应存在关联[2]。EcN 通过调控抗菌肽的表达，增加免疫球蛋白 A(IgA)和黏蛋白的分泌以及促进抗炎症免疫反应[3]，在肠道中发挥重要的免疫功能。EcN 也能通过上调紧密连接蛋白闭锁小带的表达以及促进紧密连接蛋白上调和

收稿日期：2016-10-09

基金项目：重庆市自然科学基金（cstc2016jcyjA1414）；西南大学基本科研业务费（XDJK2015D005）；国家 973 重点基础研究发展计划项目（2013CB127303）；国家 948 项目（2015Z74）

作者简介：李金龙(1992-)，男，重庆人，硕士研究生，从事分子营养学与生物饲料资源开发利用研究。E-mail: 812453072@qq.com

*通信作者：唐志如，副研究员，E-mail： tangzhiru2326@sina.com

再分布[4-5]，对增强猪肠上皮细胞的紧密连接和提高黏膜屏障具有重要的作用。口服 EcN 能显著降低断奶仔腹猪泻率和竞争性阻碍沙门氏菌入侵[6]，也能有效预防产毒素大肠杆菌的感染[7]。由此可见，EcN 对提高动物肠道免疫功能、保护肠道屏障具有重要的作用。益生菌在肠道内存活并黏附于肠道上皮细胞表面，是其发挥益生作用的前提和基础。因此，本试验旨在探明 EcN 的生长特性，耐酸、耐胆盐和耐热的性能，对猪肠上皮细胞黏附性能，以及对致病菌的抑菌效果，为 EcN 在动物生产中的应用提供参考意义。

1 材料与方法

1.1 EcN 生长曲线的测定和菌液制备

EcN 菌株购自德国微生物菌种中心（编号为 DSM 6601）。大肠杆菌 K88 菌株购自中国兽医药品监察。采用比浊法绘制 EcN 和大肠杆菌 K88 生长曲线，以培养时间（0~30 h）为横坐标，以对应的 600 nm 吸光度值（$OD_{600\ nm}$）为纵坐标绘出 EcN 的生长曲线。采用 LB 培养基培养 EcN 和大肠杆菌 K88 菌液，用无菌磷酸盐缓冲液（PBS）将菌液调整浓度约为 1.0×10^8 CFU/mL，用于体外抗逆性能、猪肠上皮细胞黏附性能和抑菌效果检测。

1.2 IPEC-J2 细胞的培养

猪空肠上皮细胞 IPEC-J2 细胞来自西南大学动物科技学院实验室的冻存细胞。将复苏细胞置于培养瓶中，加入 5 mL DMEM 完全细胞培养液（含 5%胎牛血清+1%双抗），置于 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养。待贴壁率达 85%时，胰酶消化，调整浓度约为 2.0×10^5 个/mL，置于六孔培养板中继续培养，生长至单层后进行后续试验。

1.3 体外抗逆性能检测

1.3.1 耐酸和耐胆盐

取等体积 EcN 菌液分别置于 pH 1.5、2.0 和 2.5 的模拟胃液中，以 pH 7.0 为对照。再取等体积 EcN 菌液分别置于猪胆盐浓度为 0、0.30%、0.60%和 0.90%的 LB 液体培养基中，每组 3 个重复。胃酸组和胆盐组置于 37 ℃ 200 r/min 恒温振荡器中分别培养 3 和 24 h。处理后与处理前细菌总数比值的百分数为 EcN 存活率。

1.3.2 耐热

取 4 份 9 mL 灭菌生理盐水于试管中并预热至 80 ℃，再分别加入 1 mL 菌液，保温 30、40、50 和 60 s 后，迅速冷却，对不同保温时间组菌液按 10 倍梯度进行稀释，吸取 100 μL 最佳稀释浓度菌液均匀涂抹于 LB 固体培养基上，置于 37 ℃培养箱中培养 24 h 后菌落计

数，每组 2 个重复。调节水温至 70、65 ℃，重复上述试验，用 1.3.1 中的计算方法计算 EcN 存活率。

1.4 IPEC-J2细胞黏附和抑菌试验

试验组取 2 mL DMEM 不完全细胞培养液（不含双抗）和 1 mL 各时期（迟缓、对数、平稳和衰亡期）EcN 菌液加入 IPEC-J2 细胞，以等体积无菌 PBS 替代 EcN 菌液作为对照组，每组重复 3 孔，置于 37 ℃ 5% CO_2 培养 2 h 后，PBS 漂洗 5 次，自然晾干，甲醇固定 20 min，革兰氏染色，油镜下随机选取 25 个视野，拍照和计数 100 个细胞上黏附的 EcN 菌数，细胞黏附细菌数与加入细菌总数比值的百分数为 EcN 黏附率。

试验组取EcN菌液500 μL与IPEC-J2细胞预先培养2 h后，再加入大肠杆菌K88菌液500 μL和1 mL DMEM不完全细胞培养液，以未加EcN的大肠杆菌K88菌液作为对照组。37 ℃ 5% CO_2继续培养2 h后，PBS漂洗5次，裂解细胞并10倍梯度稀释裂解液，再均匀涂抹于选择性培养基紫红胆汁琼脂（VRBA）上，平板计数。每组重复4孔，取平均值。按以下公式计算EcN对致病菌的黏附抑制率：

黏附抑制率（%）=100×（对照组－试验组）/对照组。

取100 μL大肠杆菌K88菌液均匀涂抹于琼脂培养基上，于无菌超净台上室温晾干，再用牛津杯（直径为8 mm）进行打孔。取200 μL EcN菌液置于琼脂板上孔中，37 ℃培养24 h，测定抑菌圈直径，做3个重复，取平均值判定抑菌效果。

1.5 β-防御素-2 和 Toll 样受体水平的检测

试验分为 4 组，试验组分别取 1 mL EcN（EcN 组）、大肠杆菌 K88（大肠杆菌 K88 组）及 EcN+大肠杆菌 K88 混合液（体积比 1∶1，EcN 组+大肠杆菌 K88 组）置于六孔培养板中，另以等体积 PBS 作为对照组，再加入 2 mL DMEM 不完全细胞培养液培养 3 h 后，PBS 漂洗 5 次，胰酶消化后转至 1.5 mL 离心管内，4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min，弃上清，再漂洗、离心弃上清，然后加入 1 mL 蛋白质裂解液，离心 10 min 取上清，采用蛋白质印迹（Western blot）法检测 β-防御素-2 和 Toll 样受体水平。

1.6 数据统计方法

采用Excel 2007软件进行数据整理，采用SAS 9.1.3软件进行单因素方差分析，结果以平均值和标准误（SEM）表示。

2 结果与分析

2.1 EcN 生长曲线

EcN 生长曲线如图 1 所示。接种 4 h 后呈快速上升趋势，显示其进入对数生长阶段，培养 10 h 后逐渐进入稳定期，18 h 后逐渐出现缓慢下降趋势，24 h 后此趋势较明显，逐渐进入衰亡阶段。

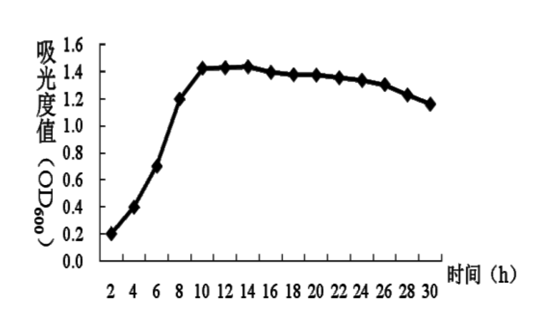


图1 EcN菌株生长曲线

Fig.1 The growth curve of EcN

2.2 EcN体外抗逆性能

EcN耐酸试验结果如表1所示。随模拟胃液pH的降低，EcN存活率显著下降（P<0.05）。当pH为2.5时，EcN存活率为30.26%，较对照组减少51.58%。pH为2.0和1.5时，EcN存活率分别为17.69%、10.44%，强酸性环境抑制EcN的生长。

表1 EcN耐酸试验结果

Table 1 Test results of acid tolerance of EcN

项目 Item	pH 7.0	2.5	2.0	1.5	SEM	P 值 P-value
EcN 存活率 EcN survival rate/%	62.50^{a}	30.26^{b}	17.69^{c}	10.44^{d}	0.69	< 0.05

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。表 2 和表 3 同。

Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as Table 2 and Table 3.

EcN耐胆盐试验结果如表2所示。对照组存活率为84.95%，随胆盐浓度增加，EcN存活率显著下降（P<0.05）。胆盐浓度为0.30%时，其存活率迅速下降至27.34%。当胆盐浓度从0.30%增加至0.90%时，存活率下降趋势较平缓。而胆盐浓度在0.60%和0.90%时，EcN存活率分别为21.03%、15.21%。高胆盐环境会抑制EcN的生长。

表2 EcN耐胆盐试验结果

Table 2 Test results of bile salt tolerance of EcN

项目 Item	胆盐浓度 Bile salt concentration/% 0	0.30	0.60	0.90	SEM	*P* 值 *P*-value
EcN 存活率 EcN survival rate/%	84.95[a]	27.34[b]	21.03[c]	15.21[d]	1.16	< 0.05

EcN 温度耐受试验结果如图 2 所示。随水浴温度升高和保持时间增加，EcN 存活率逐渐降低。不同温度保持 30、40、50 和 60 s，在 80 ℃时 EcN 存活率分别为 15.86%、11.01%、5.29%和 2.20%，存活率较低；在 70 ℃时 EcN 存活率分别为 59.03%、49.78%、43.61%和 30.40%；在 65 ℃时 EcN 存活率分别为 80.18%、73.57%、60.79%和 49.34%，存活率较高。

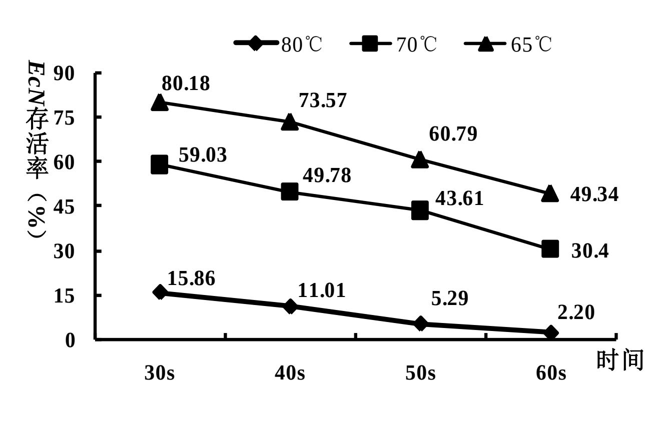


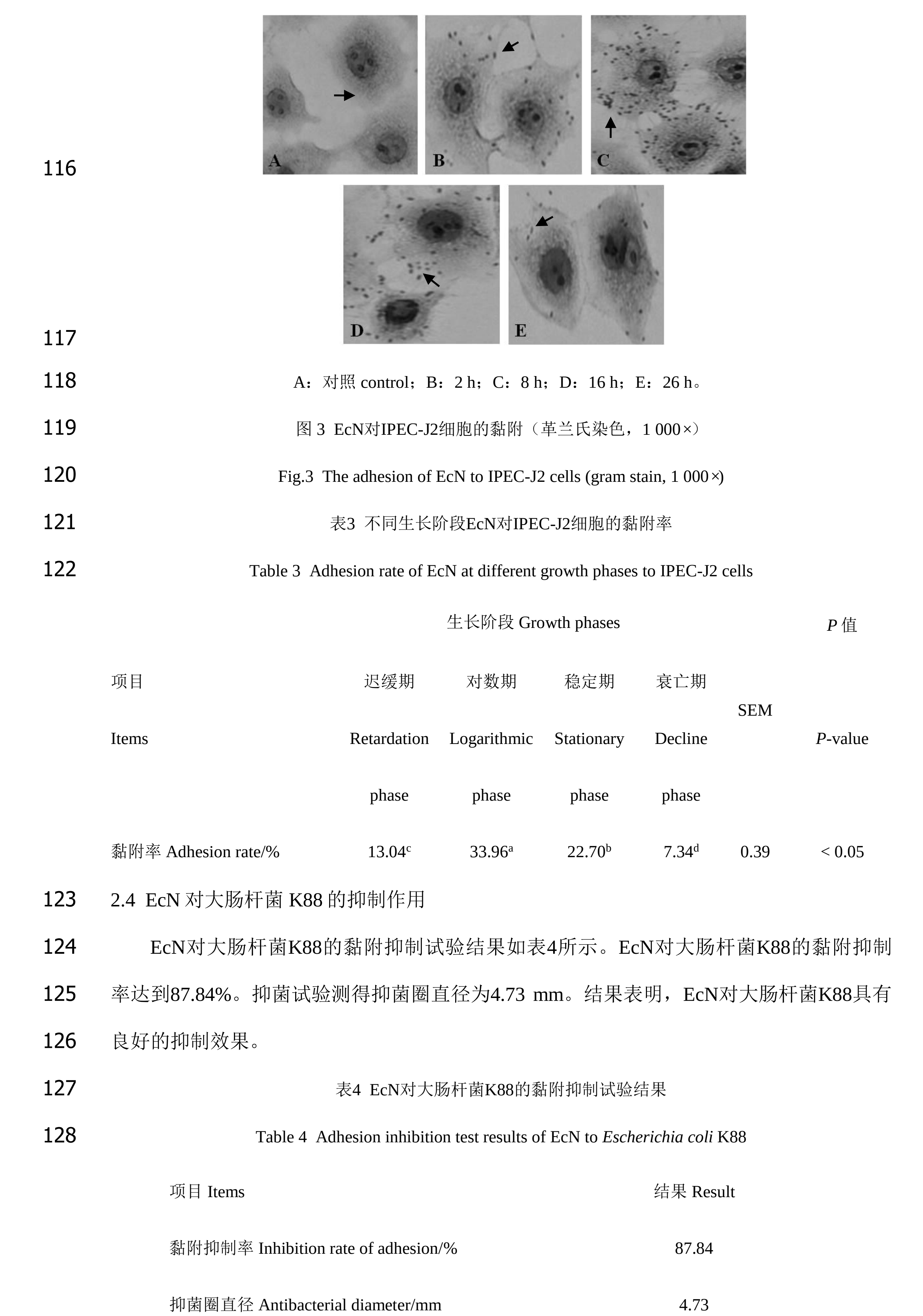
图 2 EcN温度耐受试验结果

Fig.2 Test results of temperature tolerance of EcN

2.3 EcN 对 IPEC-J2 细胞的黏附作用

以测定的 EcN 生长曲线作参考，选用培养 2、8、16 和 26 h 的 EcN，分别代表其迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个生长阶段，进行后续试验。

EcN 对 IPEC-J2 细胞的黏附作用结果如图 3 和表 3 所示。不同生长阶段的 EcN 对 IPEC-J2 细胞黏附率差异显著（P<0.05）。以对数期 EcN 的黏附性能最佳，其每 100 个细胞黏附细菌数为 3 056 个，黏附率达 33.96%；其次是稳定期，每 100 个细胞黏附细菌数为 2 043 个，黏附率达 22.70%；迟缓期和衰亡期的黏附性能分别居于第 3 和第 4，每 100 个细胞黏附细菌数分别为 1 174、661 个，黏附率分别达 13.04%、7.34%。



A：对照 control；B：2 h；C：8 h；D：16 h；E：26 h。

图 3 EcN对IPEC-J2细胞的黏附（革兰氏染色，1 000×）

Fig.3 The adhesion of EcN to IPEC-J2 cells (gram stain, 1 000×)

表3 不同生长阶段EcN对IPEC-J2细胞的黏附率

Table 3 Adhesion rate of EcN at different growth phases to IPEC-J2 cells

项目 Items	生长阶段 Growth phases				SEM	P 值 P-value
	迟缓期 Retardation phase	对数期 Logarithmic phase	稳定期 Stationary phase	衰亡期 Decline phase		
黏附率 Adhesion rate/%	13.04[c]	33.96[a]	22.70[b]	7.34[d]	0.39	< 0.05

2.4 EcN 对大肠杆菌 K88 的抑制作用

EcN对大肠杆菌K88的黏附抑制试验结果如表4所示。EcN对大肠杆菌K88的黏附抑制率达到87.84%。抑菌试验测得抑菌圈直径为4.73 mm。结果表明，EcN对大肠杆菌K88具有良好的抑制效果。

表4 EcN对大肠杆菌K88的黏附抑制试验结果

Table 4 Adhesion inhibition test results of EcN to *Escherichia coli* K88

项目 Items	结果 Result
黏附抑制率 Inhibition rate of adhesion/%	87.84
抑菌圈直径 Antibacterial diameter/mm	4.73

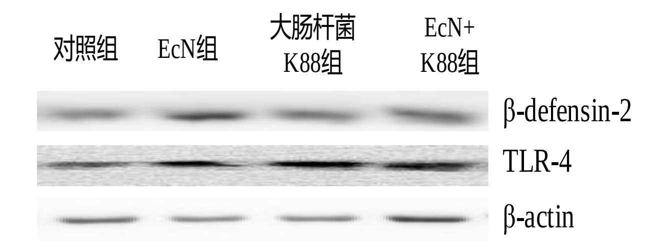
抑菌效果 Bacteriostasis result	++

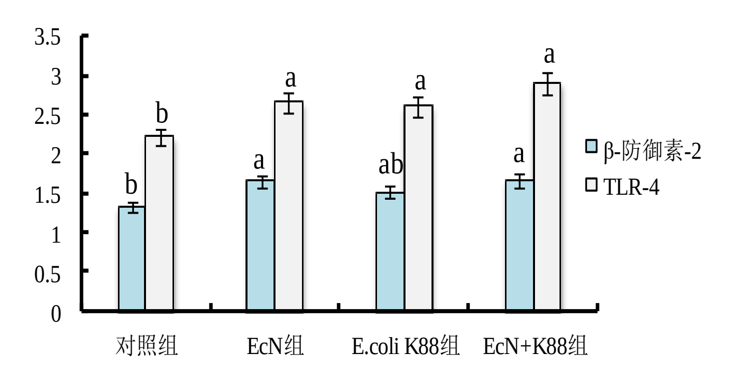
“+”代表抑菌圈直径在0~3 mm；“++”代表抑菌圈直径在3~6 mm。

"+" means antibacterial diameter in 0~3 mm; "++" means antibacterial diameter in 3~6 mm.

2.5 EcN对β-防御素-2和Toll样受体4水平的影响

EcN对β-防御素-2和Toll样受体4水平的影响如图4所示。对照组β-防御素-2水平显著低于EcN组和EcN+大肠杆菌K88组（*P*<0.05），而与大肠杆菌K88组差异不显著（*P*>0.05），对照组Toll样受体4水平显著低于其他3组（*P*<0.05）。EcN组的β-防御素-2和Toll样受体4水平低于EcN+大肠杆菌K88组，但差异不显著（*P*>0.05）。此外，大肠杆菌K88组β-防御素-2和Toll样受体4水平略低于EcN组和EcN+大肠杆菌K88组，但差异均不显著（*P*>0.05）。





数据柱形标注不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。

Data columns with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05).

图4 EcN对β-防御素-2和Toll样受体4水平的影响

Fig.4 Effects of EcN on β-defensins-2 and toll-like receptor-4 levels

3 讨 论

3.1 EcN的体外抗逆性能

研究表明，EcN拥有6种独特的铁摄取系统能产生铁螯合剂[肠菌素（enterobactin）、沙门菌螯铁蛋白（salmochelin）、耶尔森杆菌素（yersiniabactin）、产气菌素(aerobactin)、

枸橼酸铁转运系统（ferric dicitrate transport system）和楚血红素转运位点（the chu heme transport locus）]，摄取环境中的铁离子（Fe^{3+}），用于代谢时能量的产生。而中性偏酸性条件更有利于EcN铁摄取系统产生4种铁螯合剂（enterobactin、salmochelin、aerobactin和yersiniabactin）[8]。由此推测，中性偏酸性环境更适宜EcN生存。虽然本试验EcN存活率随模拟胃液pH的降低而降低，但仍保持一定的存活，可见EcN对胃酸环境具有一定的耐受能力。猪胃内pH一般在2.0~3.5，饲粮变化会使胃酸pH在1.5~5.0波动，试验结果显示，在pH 2.5的模拟胃液中EcN也能存活，提示其能通过胃酸环境，进入肠道发挥益生作用。EcN除需要耐受胃酸环境外，还应耐受肠道中胆盐形成的高渗透压环境。猪肠道内胆盐含量一般在0.03%~0.50%的范围内波动，而本试验显示高胆盐浓度（0.90%）环境下的EcN也依然能存活，可见EcN对肠道中的胆盐环境也具有一定的耐受能力。此外，EcN在高温环境中也能保持存活，表明其对温度具有一定的耐受能力。关于益生菌耐酸、耐胆盐、耐热性能的具体机制，Hatice等[9]研究发现，乳酸菌能产生胞外多糖，能耐受较低的pH和高胆盐环境，Turpin等[10]从分子水平发现益生菌乳酸片球菌（*P.acidilactici*）存在多种与耐酸、耐胆盐、耐热相关基因，如热休克蛋白（*groEL*）基因、*D*-丙氨酸转移酶（*dltD*）基因、*clpL*（一种ATP酶）基因和胆汁酸水解酶（*bsh*）基因等。因此，关于益生菌EcN耐受强酸高胆盐高温环境是否也存在上述相关或者其他潜在机制，还有待进一步研究。

3.2 EcN的黏附性能和抑菌性能

本试验对比研究了4个时期的EcN对IPEC-J2细胞黏附能力的大小，其黏附效果以对数期最佳。熊涛等[11]发现Caco-2细胞黏附罗伊氏乳杆菌数随菌龄增大呈先增后减的趋势。这提示EcN能良好地黏附于IPEC-J2细胞表面可能与其生长阶段存在关联。菌毛是细菌附着于动物消化道黏膜上皮细胞表面的重要结构，EcN自身基因组编码的*F1A*、*F1C*和卷曲菌毛能帮助其定植于IPEC-J2细胞上，并形成生物被膜抵御致病菌入侵。若缺乏*F1C*菌毛和鞭毛的表达，则会降低黏附性能和削弱对沙门氏菌入侵的抑制作用[12]。也有文献报道，EcN通过*F1C*菌毛调控对细胞的黏附作用以及对致病菌的抑菌作用。EcN诱导IPEC-J2细胞分泌β-防御素-2和促进T细胞中Toll样受体4的表达，对抑制病原菌入侵和减轻肠道炎症具有重要作用，同时EcN诱导β-防御素-2的分泌可能与鞭毛存在关联；若EcN缺失编码*F1C*菌毛和鞭毛基因，黏附率分别降低99.9%和50.0%，同时降低抑菌能力[13]。此外，EcN在IPEC-J2细胞上黏附和生长期间会形成鞭毛，其鞭毛长度和数量随培养时间的增加而增加[14]。由此可

见，EcN良好地黏附于细胞表面发挥益生作用，*F1C*菌毛和鞭毛起着重要的作用。本试验关于EcN诱导IPEC-J2细胞对β-防御素-2和Toll样受体4的表达以及黏附作用机理只作了初步探究，而更深层次的黏附性能和抗菌机制仍需要进一步研究。

本试验中，用大肠杆菌K88感染预先与EcN培养一段时间的IPEC-J2细胞，发现EcN对大肠杆菌K88黏附抑制率达87.84%。Boudeau等[15]先将IPEC-J2细胞与EcN预先培养一段时间后再加入致病性大肠杆菌进行培养和直接将2种菌同时加入IPEC-J2细胞进行培养，对比研究EcN对致病性大肠杆菌的抑制作用，结果发现前者的抑制率为97.2%~99.9%，后者为78.0%~99.9%。Klete等[16]和Malchow等[17]也报道了预先将EcN与IPEC-J2细胞培养，能降低致病性大肠杆菌对细胞的感染机率，并影响致病菌对细胞的黏附和侵袭能力，而将EcN与沙门氏菌同时加入时，仅减少沙门氏菌入侵率为70%[18]。推测EcN对细胞的黏附作用以及其生理功能的发挥可能存在时间效应。研究表明，增加EcN与细胞的预先培养时间有利于抑制病原菌的入侵，同时提高EcN的剂量，抑制效果更好[12]。EcN预先培养和较高剂量使用也有利于提高肠道黏蛋白mRNA的表达水平[19]。综上研究，EcN制剂在生产实践中尽早并高剂量使用，可能会更好的发挥益生作用。

本试验只对EcN相关机理只作了初步的探索，关于EcN黏附机理和对致病菌黏附抑制作用以及抗逆性能的研究，还需要从分子水平进行更深入的探索。

4 结 论

① EcN对猪肠上皮细胞黏附效果以对数期最佳，并对致病菌大肠杆菌K88存在较强的抑制作用。

② EcN面对高酸、高胆盐环境也呈现一定的抗逆性能，有利于其在胃肠道内发挥生理作用。

参考文献：

[1] JACOBI C A,MALFERTHEINER P.*Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor):new insights into an old probiotic bacterium[J].Digestive Diseases,2011,29(6):600–607.

[2] VAARALA O.Immunological effects of probiotics with special reference to *Lactobacilli*[J].Clinical & Experimental Allergy,2003,33(12):1634–1640.

[3] TREBICHAVSKY I,SPLICHAL I,RADA V,et al.Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli strain* Nissle 1917[J].Nutrition Reviews,2010,68(8):459–464.

[4] UKENA S N,SINGH A,DRINGENBERG U,et al.Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity[J].PLoS One,2007,2(12):e1308.

[5] HERING N A,RICHTER J F,FROMM A,et al.TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKCζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells[J].Mucosal Immunology,2014,7(2):369–378.

[6] SPLICHALOVA A,TREBICHAVSKY I,RADA V,et al.Interference of *Bifidobacterium choerinum* or *Escherichia coli* Nissle 1917 with *Salmonella* Typhimurium in gnotobiotic piglets correlates with cytokine patterns in blood and intestine[J].Clinical & Experiment Immunology,2011,163(2):242–249.

[7] SCHROEDER B,DUNCKER S,BARTH S,et al.Preventive effects of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute secretory diarrhea in a pig model of intestinal infection[J].Digestive Diseases and Sciences,2006,51(4):724–731.

[8] VALDEBENITO M,CRUMBLISS A L,WINKELMANN G,et al.Environmental factors influence the production of enterobactin,salmochelin,aerobactin,and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917[J].International Journal of Medical Microbiology,2006,296(8):513–520.

[9] HATICE B,BELMA A,GULCIN A.The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria[J].Archives of Biological Sciences,2010,62(2):323–328.

[10] TURPIN W,HUMBLOT C,GUYOT J P.Genetic screening of functional properties of *Lactic acid bacteria* in a fermented pearl millet slurry and in the metagenome of fermented starchy foods[J].Applied and Environmental Microbiology,2011,77(24):8722–8734.

[11] 熊涛,邓耀军,黄涛,等.罗伊氏乳杆菌NCU801对病原菌的粘附抑制性能[J].南昌大学学报，2015,39(2):179–183.

[12] SCHIERACK P,KLETA S,TEDIN K,et al.*E. coli* Nissle 1917 affects *Salmonella* adhesion to porcine intestinal epithelial cells[J].PLoS One,2011,6(2):e14712.

[13] SEO E J,WEIBEL S,WEHKAMP J,et al.Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins[J].International Journal of

Medical Microbiology,2012,302(6):276–287.

[14] KLETA S,NORDHOFF M,TEDIN K,et al.Role of F1C fimbriae,flagella,and secreted bacterial components in the inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on atypical enteropathogenic *E. coli* infection[J].Infection and Immunity,2014,82(5):1801–1812.

[15] BOUDEAU J,GLASSER A L,JULIEN S,et al.Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn’s disease[J].Alimentary Pharmacology and Therapeutics,2003,18(1):45–56.

[16] KLETA S,STEINRÜCK H,BREVES G,et al.Detection and distribution of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 clones in swine herds in Germany[J].Journal of Applied Microbiology,2006,101(6):1357–1366.

[17] MALCHOW H A.Crohn’s disease and *Escherichia coli*:a new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn’s disease?[J].Journal of Clinical Gastroenterology,1997,25(4):653–658.

[18] ALTENHOEFER A,OSWALD S,SONNENBORN U,et al.The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens[J].FEMS Immunology & Medical Microbiology,2004,40(3):223–229.

[19] HAFEZ M M.Upregulation of intestinal mucin expression by the probiotic bacterium *E. coli* Nissle 1917[J].Probiotics and Antimicrobial Proteins,2012,4(2):67–77.

Probiotics *Escherichia coli Nissle* 1917: Stress resistance, Swine Intestinal Epithelial Cell Adhesion Rate and Antimicrobial Effects

LI Jinlong DENG Huan LIU Jinyan MAO Junxia WANG Yao TANG Zhiru*

(*Key Laboratory for Bio-Feed and Animal Nutrition*, *College of Animal Science and Technology*, *Southwest University*, *Chongqing* 400715, *China*)

*Corresponding author, associate professor, E-mail： tangzhiru2326@sina.com (责任编辑 王智航)

Abstract: This experiment was conducted to investigate stress resistance, swine intestinal epithelial cell adhesion rate and antimicrobial effects of probiotics *Escherichia coli Nissle* 1917 (EcN). The growth curve, acid, bile salt and heat tolerance were analyzed using *in vitro* methods; IPEC-J2 cells of swine intestinal epithelial cells were selected as the *in vitro* cell model to investigate the effects of EcN on adhesion rate and inhibition rate of adhesion to an pathogenic bacterium *Escherichia coli* K88; meanwhile, the effects of EcN on levels of β-defensin-2 and toll-like receptor 4 of IPEC-J2 cells were identified by Western blot. The results showed as follows: 1) EcN could survive in strong acid, high concentration of bile salt and high temperature. 2) EcN in logarithmic phase had the highest intestinal epithelial cell adhesion effect and its adhesion rate was 33.96%, which was significantly higher than that in retardation phase, stationary phase and decline phase (P<0.05). 3) EcN had good inhibitory effect on pathogenic bacterium *Escherichia coli* K88 and its inhibition rate of adhesion was 87.84%. 4) EcN could up-regulate the levels of β-defensins-2 and toll-like receptor 4. In conclusion, the probiotics EcN presents stress resistance, has great swine intestinal epithelial cells adhesion capacity, and prevents attack from pathogenic bacteria *Escherichia coli* K88.

Key words: *Escherichia coli* Nissle 1917; swine intestinal epithelial cell; IPEC-J2 cell; adhesion property; stress resistance; heat tolerance; antimicrobial effects